

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-308186

(43)Date of publication of application : 28.11.1995

(51)Int.Cl.

C12M 3/04
H01L 51/00
// G01N 27/327

(21)Application number : 06-287588

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 26.10.1994

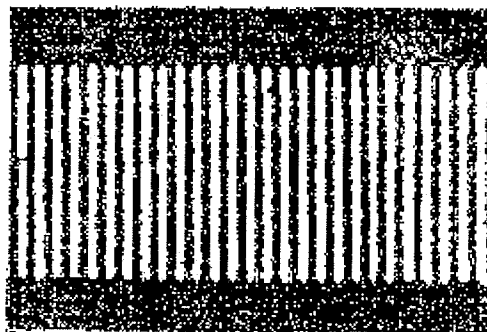
(72)Inventor : MATSUDA TAKEHISA
INOUE KAZUHIKO
TANI NOBUTAKA

(54) TOOL FOR CONTROLLING CELL SEQUENCE AND METHOD FOR CONTROLLING CELL SEQUENCE

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a tool capable of readily controlling a cell sequence in high-accuracy by culturing a cell by the same manner as that of a conventional cell culture and easily forming a cell sequence pattern having extreme fineness and a high resolution.

CONSTITUTION: A cell adhesion surface comprising a cell adhesion polymer is immobilized to a cell nonadhesion surface in a patterned state or a cell nonadhesion surface comprising a cell nonadhesion is immobilized to a cell adhesion surface in a patterned state to provide a tool for controlling a cell sequence, having a sequence pattern composed of the cell adhesion surface and the cell nonadhesion surface. A method for controlling a cell sequence, capable of culturing a cell by using the tool for controlling a cell sequence is provided.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-308186

(43) 公開日 平成7年(1995)11月28日

(51) Int. Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 M 3/04

Z

H 0 1 L 51/00

// G 0 1 N 27/327

H 0 1 L 29/ 28

G 0 1 N 27/ 30

3 5 1

審査請求 有 請求項の数 3 F D (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平6-287588

(62) 分割の表示

特願平1-141964の分割

(22) 出願日

平成1年(1989)6月3日

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 松田 武久

大阪府箕面市栗生外院244-1、B-512

(72) 発明者 井上 和彦

兵庫県神戸市須磨区横尾8丁目1-1、42-504

(72) 発明者 谷 敏幸

大阪市阿倍野区文の里4丁目17-29

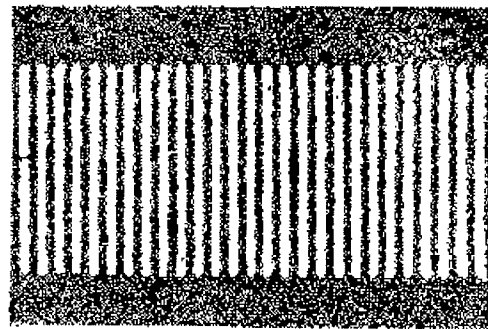
(74) 代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外1名)

(54) 【発明の名称】 細胞の配列制御用具および細胞の配列制御法

(57) 【要約】

【目的】 従来の細胞培養と同様にして培養を行なって容易に精度の高い細胞配列制御をすることができ、極めて微細かつ高解像度の細胞配列パターンを容易に形成することができる細胞の配列制御用具をうる。

【構成】 細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりなる細胞接着性表面がパターン状に固定化されてなる、または細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりなる細胞非接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具、および前記細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法。



(2)

特開平 7-308186

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりなる細胞接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具。

【請求項 2】 細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりなる細胞非接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具。

【請求項 3】 請求項 1 または請求項 2 記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、細胞の配列制御用具および細胞の配列制御法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、細胞工学、LSI 技術、医工学などの急激な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、さらにはニューロコンピューターなどが注目を集め、これらの開発が活発に行なわれている。

【0003】 細胞を望むように配列させ、しかもその機能を維持させておくことは難しく、細胞を用いたデバイス実現の一つの障壁となっている。細胞を望むように配列させて回路網を形成させるといような細胞の配列制御技術は、これらのデバイス実現のための大きなキーテクノロジーとなりうる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 細胞の配列を制御する試みとしては、インクジェットプリンターを用いて細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンを塗布してパターンを形成し、この上で細胞を培養させた例があるが、解像度がわるく不均一であり、微細加工には適していない。

【0005】 また、最近、人工的な凹凸面を用いて神経細胞シナプス成長の方向制御を試みた例があるが、望むような配列を形成させるまでには至っていない。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、このような実状に鑑み、細胞の配列を容易に制御する方法について鋭意研究を重ねた結果、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する材料表面上で細胞を培養することにより、細胞の配列が容易に制御できること、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する細胞の配列制御用具が、特定の工程を経て容易に製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明は細胞非接着性表面に、細胞接着性高分子よりなる細胞接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具（請求項 1）、細胞接着性表面に、細胞非接着性高分子よりなる細胞非接着性表面がパターン状に固定化されてなる、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞の配列制御用具（請求項 2）および請求項 1 または請求項 2 記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法（請求項 3）に関する。

【0008】

【実施例】 本発明の細胞の配列制御用具は、パターン化した細胞接着性表面と細胞非接着性表面とが本発明の細胞の配列制御用具となる材料の表面に形成されたものである。

【0009】 前記細胞接着性表面とは、カルボキシル基やアミノ基などの電荷を有する官能基および（または）RGDS(Arg-Gly-Asp-Ser) のような細胞接着性ペプチドを導入した表面、または細胞接着性を有する高分子を固定した表面をいう。

【0010】 前記カルボキシル基やアミノ基などの官能基は、本発明の配列制御用具となる材料表面をプラズマなどの放射線で処理することにより導入することができる。この際の前記材料としてはプラスチック製の培養皿、フィルム、チューブなどを利用しうる。

【0011】 前記細胞接着性を有する高分子の具体例としては、たとえばポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミンなどの電荷を有する合成高分子、コンドロイチン硫酸、デルマトラン硫酸、デキストラン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの電荷を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ハイドロネクチンなどの細胞接着性蛋白質、さらには細胞接着性蛋白質や細胞接着性ペプチドを固定した合成高分子などがあげられるが、これらに限定されるものではない。これらは単独で用いてもよく、2 種以上を併用してもよい。

【0012】 また、前記細胞非接着性表面とは、接触角が 100 度以上の疎水性表面、または電荷を有さず接触角が 50 度以下の親水性表面をいう。

【0013】 前記疎水性表面の具体例としては、たとえばポリテトラフルオロエチレン、シリコンなどから形成された表面があげられるが、これらに限定されるものではない。

【0014】 また、前記接触角が 50 度以下の親水性表面の具体例としては、電荷を持たない親水性高分子よりなる表面、たとえばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、さら

(3)

特開平7-308186

3

4

にはこれらを構成する単量体の共重合体、セルロースなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。

【0015】さらに、本発明の細胞の配列制御用具を形成しうる素材としては、たとえば各種プラスチック、ガラス、金属などがあげられ、すでにデバイスとして用いられているたとえば培養皿、半導体基盤などの材料も利用できる。

【0016】つぎに前記細胞の配列制御用具の製法について説明する。

【0017】まず第1の製法として、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを

(1) 感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2) (1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3) 洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させる工程を経て形成する方法を説明する。

【0018】第1の製法においては、たとえば細胞非接着性親水性高分子、好ましくは前記電荷を持たない親水性高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物とからなる組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞接着性表面に容易に固定される。また、前

記高分子に直接アジド基を導入したものをを用いることもできるが、アジド基を導入する特別な操作が不要な点および現像時の未反応物の除去が容易な点で、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を用いるのが好ましい。

【0019】前記2個以上のアジド基を有する化合物としては、たとえば第1表に示すような一般のビスアジド化合物、1分子中に2個以上のアジド基を導入したアジド化ポリマーなどが利用できるが、これらに限定されるものではない。上記アジド基には、たとえばカルボニルアジド ($R-CO-N_3$)、スルホニルアジド ($R-SO_2-N_3$)、芳香族アジド

【0020】

【化1】



などがあるが、安定性のよい芳香族アジドまたはスルホニルアジドが好ましい。また、より長波長域の光でナイトレンに転化できる点で、ニトロ基のような電子吸引性置換基を有する芳香族アジド、γ線またはβ線感光性のビスアジド化合物がさらに好ましい。

【0021】

【表1】

特開平 7-308186

16

25

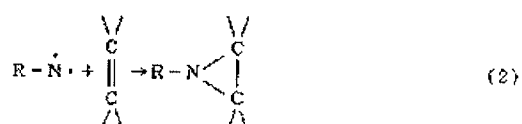
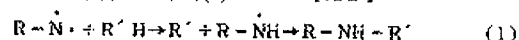
ヒスアジド化合物	感光領域
$N_3-C_6H_4-CH_2-C_6H_4-N_3$	deep UV
$Cl-C_6H_3(N_3)-CH_2-C_6H_3(N_3)-Cl$	"
$N_3-C_6H_4-O-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-SO_2-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_3(N_3)-SO_2-C_6H_3(N_3)-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-SS-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-S-C_6H_4-N_3$	"
$CH_3O-C_6H_3(N_3)-CH=CH-C_6H_3(N_3)-OCH_3$	i 線
$N_3-C_6H_4-CH=CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH=CH-C(=O)-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH=CH-C(=O)-CH=CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH-C(=O)-CH_2-C(=O)-CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH-C(=O)-CH_2-C(=O)-CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH-C(=O)-CH_2-C(=O)-CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH=CH-C(=O)-CH=CH-C_6H_4-N_3$	"
$N_3-C_6H_4-CH=CH-CH_2-C(=O)-CH_2-CH=CH-C_6H_4-N_3$	"

該高分子は、アジド基が光照射により転化したナイトレン基が、細胞接着性表面および該高分子に対して、たとえば次式に示すような化学反応、すなわち、水素引抜き反応(1)、二重結合への付加やC-H結合への挿入(2)＊

*、およびカップリング反応(3)を行なうことにより固定される。

[0022]

【化2】



なお、ナイトレン基はきわめて反応性が高いため、上記の反応以外の反応による結合が生じるばあいもある。また、上記反応が該高分子間に生じ、架橋が生じるばあいがあるが、これにより該高分子がより安定的に細胞接着性表面に固定されるばあいがある。さらに、該高分子が 50

前述のごとく細胞接着性表面に結合していなくても、皮膜として付着し固定されていてもよい。

【0023】該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を細胞接着性表面に存在させる方法としては、該組成物をメタノールのような揮発性有機溶

(5)

特開平7-308186

7

媒に溶解または懸濁し、この液を細胞接着性表面に、塗布または噴霧したのち乾燥し、該組成物の薄層を細胞接着性表面に形成させる方法。該組成物の水溶液またはコロイド溶液と細胞接着性表面とを接触させ、細胞接着性表面に吸着させる方法などがある。これらのなかでも均質な薄層がえられる点で、揮発性有機溶媒の溶液を用いてキャスト製膜する方法が好ましい。

【0024】また、2個以上のアジド基を有する化合物を細胞接着性表面に存在させたのち、その上に該高分子を存在させてもよい。

【0025】前記光照射に用いる光源としては、高圧水銀灯、低圧水銀灯、超高圧水銀灯などの各種水銀灯、エキシマレーザーなどがあるが、長波長域で感光可能なアジド化合物を用いるばあいには、フィルターにより短波長域をカットすることにより、短波長紫外線による該高分子や材料表面への影響を軽減することができる。これは蛋白質などの親水性高分子を用いるばあいに好ましい。

【0026】また、ナイトレン基の反応は極めて短時間で完了するため、露光時間は5分以内でよい。

【0027】パターン露光の方法は、パターンを有するフォトマスクを設置した上より光照射する方法、エキシマレーザーによるリソグラフィを利用する方法などがある。

【0028】一方、細胞の配列制御用具の第2の製法は、前記第1の製法の(1)の工程において、感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させるかわりに、感光性を有する前記細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させるほかは、第1の製法と同様にして製造する方法である。

【0029】第2の製法によれば、たとえば前記細胞接着性を有する高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞非接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞非接着性表面に容易に固定される。

【0030】前記のごとく製造される細胞の配列制御用具を用い、常法により細胞を培養することにより、細胞配列を容易に制御でき、 μm オーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。

【0031】えられた微細パターンは、超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピュータなどの開発に有用である。

【0032】つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0033】実施例1

N、N-ジメチルアクリルアミドモノマー（株）興人 50

8

製）をアセトン中、過酸化ベンゾイルおよびN、N-ジメチル-p-tert-ブチルイソリンをレドックス系開始剤として重合し、ポリ（N、N-ジメチルアクリルアミド）（以下、PDMAA という）をえた。

【0034】えられたPDMAA 95部（重量部、以下同様）に対して、ビスアジド化合物である4、4'-ジシアジドスチルベン-2、2'-ジスルホン酸ソーダ5部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1%（重量%、以下同様）溶液とした。

10 【0035】この溶液を、組織培養用ポリスチレンシャーレ（コーニング（CORNING）社製）上に滴下し、キャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、この上に図3に示すような開孔部と非開孔部とからなる一対の幅が250 μm であるスリットを有するフォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。なお、図3はフォトマスクの写真のスケッチ図である。

【0036】つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PDMAA およびシャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

20 【0037】このようにしてえたシャーレに、牛血管内皮細胞を播種し、15%牛血清（FCS）を含むDMEM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）を培地として用い、37℃のCO₂ インキュベーター内で培養したところ、内皮細胞はPDMAA 非固定部（非露光部）のみに選択的に増殖し、図1および図2に示す細胞の配列パターンがえられた。図1は染色された細胞の配列パターンの写真（倍率は図3のものになる写真と同じ）のスケッチ図、図2は図1のものになる写真よりさらに拡大された写真のスケッチ図である。

【0038】実施例2

実施例1のばあいと同様にして調製したビスアジド化合物を含むPDMAA の0.1%メタノール溶液を、ポリスチレンシャーレ上に滴下し、キャスト製膜して風乾したのち、高圧水銀灯を用いて紫外線を照射し、PDMAA を光固定したシャーレ（以下、PDMAA シャーレという）をえた。

【0039】N、N-ジメチルアクリルアミド80部とアクリロキシシロハク酸イミド（国産化学製）20部よりなる共重合体とフィブロネクチンとを、リン酸緩衝液（pH8.5）中で反応させ、フィブロネクチンを固定したN、N-ジメチルアクリルアミド共重合体（以下、FN-PDMAAという）をえた。

【0040】FN-PDMAA 95部に対してビスアジド化合物5部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1%溶液とした。

【0041】えられた溶液をPDMAA シャーレ上にキャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、フォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。

(5)

特開平 7-308186

9

10

【0042】つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、FN-PDMSおよびPDMS シャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

【0043】このようにしてえたシャーレを用いて実施例1のばあいと同様にして、牛血管内皮細胞を培養したところ、内皮細胞は、FN-PDMS固定部（露光部）のみに選択的に伸展・増殖し、細胞による配列パターンがえられた。

【0044】

【発明の効果】本発明の細胞の配列制御用具は、細胞の付着の有無の選択性がよく、これを用いることにより、従来の細胞培養と同様にして培養を行なって容易に精度の高い細胞配列制御をすることができ、極めて微細かつ高解像度の細胞配列パターンを容易に形成することができ

*きる。

【0045】本発明は、各種細胞機能に応用した超小型バイオセンサー、スイッチング素子、ハイブリッド型人工臓器、バイオリアクター、ニューロコンピュータなどの開発に大きく貢献するものである。また、細胞間の情報伝達などの細胞機能の研究においても応用できるものである。

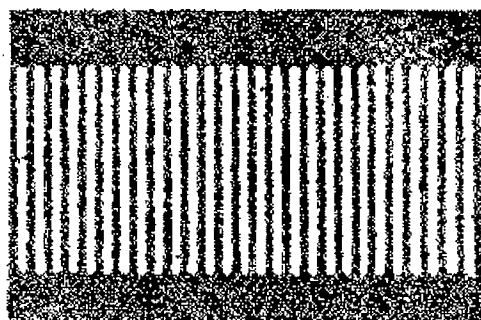
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は染色された細胞の配列パターンの写真のスケッチ図である。

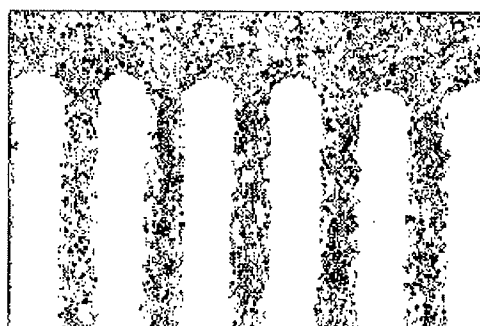
【図2】図2は図1のもとになる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図である。

【図3】図3はフォトマスクの写真（倍率は図1のもとになる写真と同じ）のスケッチ図である。

【図1】



【図2】



【図3】

